

MANUAL

Kit S QuickGene de extracción de ADN en Sangre Total (DB-S)

Para aislamiento de ADN genómico de sangre total

ÍNDICE

1 Introducción

Fuji Photo Film Co., LTD desarrolló y patentó una revolucionaria membrana porosa para inmovilizar ácido nucleico. Debido a su gran área superficial específica, y a su porosidad fina y uniforme, QuickGene aísla satisfactoriamente ADN genómico con alto rendimiento; y más aún , con la utilización de su membrana, elimina la mayoría de los contaminantes. QuickGene utiliza la técnica de filtración a presión, la cual no puede utilizarse satisfactoriamente con membranas típicas de fibra de vidrio; utilizando la técnica de filtración a presión se puede usar con gran éxito una nueva instrumentación, compacta y automatizada para la purificación rápida de ácido nucleico.
Utilizando el kit S de QuickGene para extracción de ADN en Sangre Total junto con la serie de Sistemas Automáticos de Aislamiento de Ácido Nucleico QuickGene se podrá aislar y también purificar ADN genómico de sangre total con muy alta calidad y rendimiento. Adicionalmente, se pueden extraer simultáneamente y en sólo 6 minutos, 8 muestras lisadas de sangre total. El ADN genómico, de alta calidad, purificado se puede utilizar para aplicaciones con PCR , digestión con enzimas de restricción, Southern Blotting, y otras aplicaciones.

Por favor asegúrese de leer cuidadosamente este manual antes de la utilización del kit.

2 Componentes del kit

El kit incluye los reactivos necesarios para 96 conjuntos de aislamiento de ADN genómico.

- ❑ Proteasa (EDB)
- ❑ Tampón de Lisis (LDB)
- ❑ Tampón de Lavado (WDB)
- ❑ Tampón de Elución (CDB)
- ❑ Cartuchos (CA)
- ❑ Tubos de recogida (CT)
- ❑ Tapones (CAP)
- ❑ Tubos de desecho (WT)

3 Condiciones de Almacenamiento

Temperatura de almacenamiento para todos los reactivos: de 15 ºC a 28ºC

4 Otros materiales necesarios, no incluidos en este kit

♦**Reactivos**

- Etanol (>99%)
- Agua ultra pura libre de Nucleasa (para disolución de proteasa)

♦**Instrumentos y Equipamiento**

- Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico de la serie QuickGene
- Tubos de centrigufa de 1.5ml
- Tubos de Centrifuga (ver Tabla 1)
- Micropipetas y puntas
- Agitador Vortex Mixer
- Microcentrifuga (c.a. 5,000xg)
- Contenedor de tubos

Tabla 1. Tubos de Centrífuga recomendados

Tamaño del Contenedor de tubos de centrífuga de la serie QuickGene	**Tipo de tubo de centrífuga**	**Nombre del producto (ejemplos)**
Estándar	Tubo de centrífuga grande (para WDB)	Tubo cónico BD Falcon™ 50ml
	Tubo de centrífuga pequeño (para CDB)	Tubo cónico BD Falcon™ 15ml
Grande	Tubo de centrífuga grande (para WDB)	Tubo cónico BD Falcon™ 175ml Tubo cónico BD Falcon™ 225ml
	Tubo de centrífuga pequeño (para CDB)	Tubo cónico BD Falcon™ 50ml

Los tubos de centrifuga se usan con los Sistemas de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico de la serie QuickGene como tubos contenedores del tampón de lavado (WDB) con etanol y del tampón de elución (CDB).

5 Advertencias sobre Seguridad

Advertencia: Para uso en investigación únicamente
No recomendado ni dirigido a aplicaciones diagnósticas o clínicas para humanos y animales.

Todos los reactivos y artículos del kit deberían considerarse química y biológicamente peligrosos. Durante la realización de los experimentos es altamente recomendable utilizar la vestimenta apropiada de laboratorio, guantes y gafas de seguridad. En caso de contacto de los reactivos con los ojos, la piel o la vestimenta, lávese inmediatamente con agua. (consulte las recomendaciones específicas en la hoja de datos de Seguridad Material, http://www.fujifilm.co.jp/msds

Proteasa (EDB)
Tenga cuidado con el contacto de los reactivos con los ojos, y con su ingestión accidental.
En caso de contacto de los reactivos con los ojos, piel o vestimenta, lave inmediatamente con agua.

Tampón de Lisis (LDB)
No ingerir. Producto venenoso
Tenga cuidado con el contacto de los reactivos con los ojos, y con su ingestión accidental.
En caso de contacto de los reactivos con los ojos, piel o vestimenta, lave inmediatamente con agua.
Utilice la vestimenta apropiada de laboratorio, guantes y gafas de seguridad.

Tampón de Lavado (WDB)
Tenga cuidado con el contacto de los reactivos con los ojos, y con su ingestión accidental.
En caso de contacto de los reactivos con los ojos, piel o vestimenta, lave inmediatamente con agua.

Tampón de Elución (CDB)
Tenga cuidado con el contacto de los reactivos con los ojos, y con su ingestión accidental.
En caso de contacto de los reactivos con los ojos, piel o vestimenta, lave inmediatamente con agua.

- Mantenga el Tampón de Lisis (LRB) lejos de fuentes de calor. No lo mezcle con desinfectantes, como la lejía.
- En cuanto al tratamiento de los residuos líquidos y los consumibles: Cuando utilice muestras potencialmente infecciosas para sus experimentos, realice el tratamiento de los residuos de acuerdo con la normativa aplicable.

6 Advertencias

- Consulte el MSDS (hoja de datos de Seguridad Material) para revisar las recomendaciones específicas de manipulación y propiedad.. Esta hoja de datos (MSDS), se puede obtener de la siguiente página web: http://lifescience.fujifilm.com
- Consulte el Manual de usuario del Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico de QuickGene, antes de utilizarlo.

7 Controles de Calidad

- La estabilidad de los reactivos está garantizada por un año desde la compra siempre que se haya almacenado a la temperatura especificada (de 15ºC a 28ºC)
- Como parte del riguroso programa de calidad en Fuji Photo Film Co, LTD, las prestaciones del kit S QuickGene ADN en Sangre Total se evalúan rutinariamente, asegurando la uniformidad de lote a lote.
- Se comprueba la calidad y el rendimiento de los ADN genómicos aislados, por medio de la medida de la absorbancia a 260nm, relación de absorbancia (260nm/280nm) y amplificación PCR.

8 Protocolos

8.1 Preparación de los Reactivos

Proteasa (EDB)
Añada 3.3 ml de agua ultra pura libre de nucleasa al vial que contiene la proteasa congelada en hielo seco y disuélvala cuidadosamente.
La proteasa disuelta (EDB) se podrá almacenar por 2 meses a 4ºC
La enzima permanecerá estable por un período más largo si se conserva a -20ºC. Esto está recomendado para evitar la repetida congelación y descongelación.

Tampón de Lisis (LDB)
Mezcle muy bien antes de usar.
Si hay precipitados en el Tampón de Lisis, incube la botella en un baño de agua a 37ºC y mezcle invirtiendo la botella intermitentemente hasta que el precipitado se haya disuelto. Una vez disuelto el Tampón de Lisis, enfríe la botella a temperatura ambiente antes de su uso.

Tampón de Lavado (WDB)
Añada a la solución concentrada
Añada 160ml de etanol (>99%) en la botella y mezcle invirtiendo la botella suavemente antes de su primer uso.

Requerimientos para el Tampón de Lavado (WDB) con etanol (>99%) y el Tampón de Elución (CDB)
Prepare los volúmenes de muestra requeridos para la preparación del Tampón de Lavado (WDB) con etanol(>99%) y del Tampón de Elución (CDB), de acuerdo con el número de muestras para la extracción; siga la tabla siguiente:
Coloque los tampones en cada tubo y coloque los tubos en el Contenedor de Tubos del equipo QuickGene. (Consulte el Manual de Usuario del Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico de QuickGene).

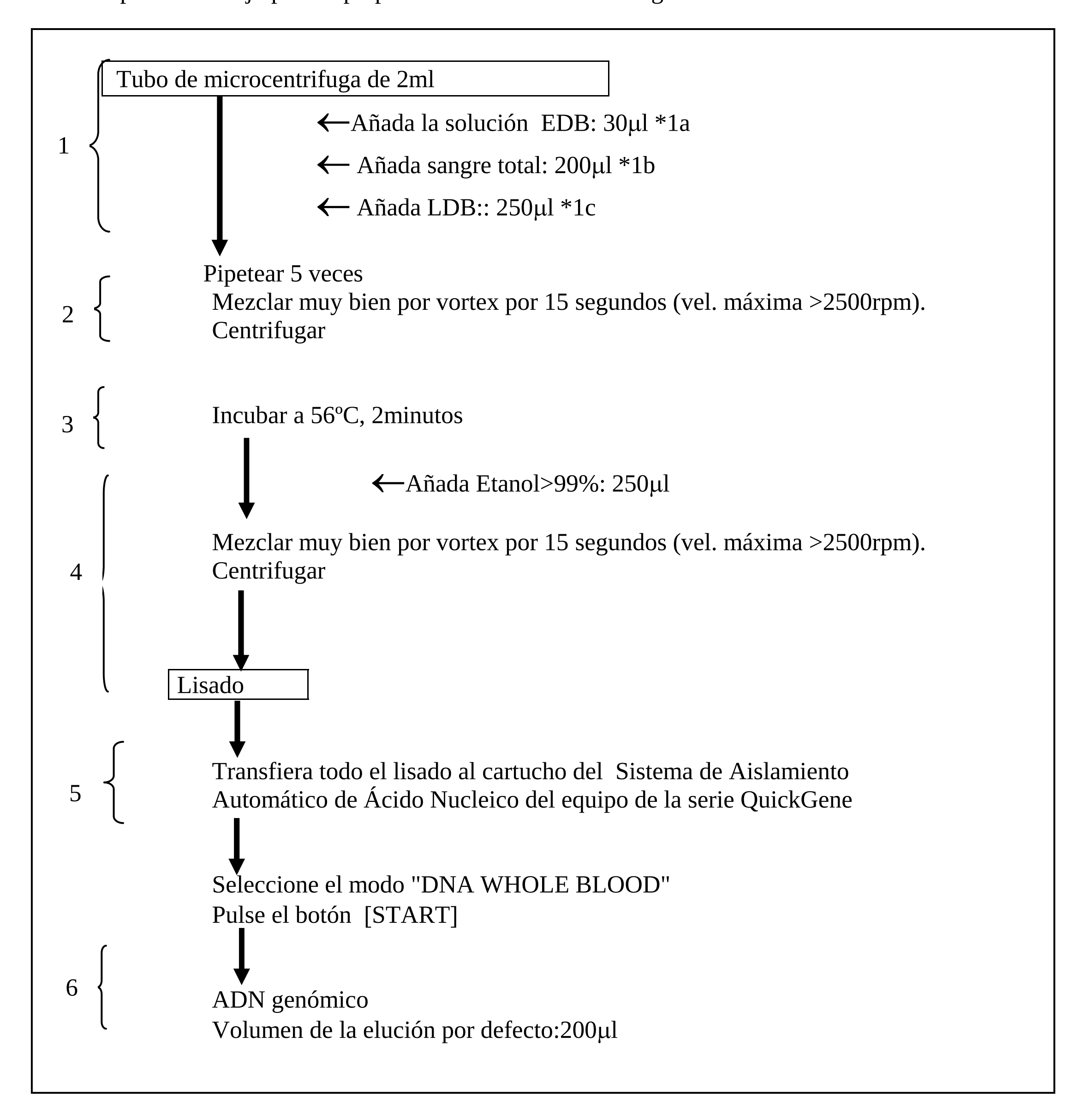
Tabla 2 Volumen del tampón y número de muestras a colocar en el equipo QuickGene

Número de Muestras	WDB con Etanol	CDB
8	26 ml	8 ml
16	44 ml	11 ml
24	62 ml	13 ml
32	80 ml	15 ml
40	99 ml	17 ml
48	117 ml	19 ml
56	135 ml	21 ml
64	154 ml	22 ml
72	172 ml	24 ml
80	190 ml	26 ml
88	209 ml	28 ml
96	227 ml	30 ml

8.2 Preparación de Muestras

- El kit S QuickGene de extracción de ADN en Sangre Total ha sido específicamente diseñado para el aislamiento de ADN genómico de una muestra de 200µl de sangre total.
- Se recomienda la utilización de sangre total recogida en EDTA-2NA, EDTA-2K o heparina.
- El rendimiento obtenido dependerá de las condiciones y características de la muestra.
- Trabaje con el kit a temperatura ambiente (15ºC a 30ºC). El rendimiento podría no ser el esperado si trabaja a temperaturas por encima o por debajo del rango de temperaturas indicado.
- Mida con precisión el volumen de los tampones durante los experimentos.

<Etapas de Trabajo para la preparación de muestras de sangre total>



Notas

1. Siga estrictamente el protocolo desde los pasos 1 a 1c. Si no se sigue o se cambia el protocolo, se verá reducido el rendimiento
   1a; Añada 3.3 ml de agua ultra pura libre de nucleasa al vial que contiene la proteasa congelada en hielo seco y disuélvala cuidadosamente.
   Añada los 30µl de EDB en el fondo de un microtubo de 2ml
   1b; Añada 200µl de sangre total en el microtubo, e inmediatamente después añada 250µl de LDB. (si no se añade LDB inmediatamente, el rendimiento se podría ver reducido).
   1c; Mezcle la muestra de sangre total y el LDB pipeteando 5 veces.
   Es muy importante mezclar completamente la muestra por pipeteo después de la adición de LDB.
2. Agitar por vortex por 15 segundos a máxima velocidad y centrifugar para recuperar el lisado del tapón y las paredes del tubo.
   La velocidad de vortex recomendada es de 2500 rpm en adelante. (si no dispone de tal agitador vortex, pipetee completamente como en 1c.)
   Si la mezcla no es completa en este paso, el rendimiento será inferior al esperado o se producirá obstrucción del cartucho del Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico del equipo de la serie QuickGene.
3. Incubar a 56ºC. El tiempo máximo de incubación es 5 minutos
4. Añada 250µl de etanol >99% y agite por vortex durante 15 segundos a máxima velocidad.
   Centrifugue para recuperar el lisado en el tapón y paredes del tubo.
5. Transfiera el lisado completo al cartucho del Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico del equipo de la serie QuickGene. Realice el aislamiento en un período máximo de 30 minutos después de la preparación del lisado.
   Si hay presentes agregados en el lisado aplíquelos junto con el lisado en el cartucho
6. El volumen estándar de elución por defecto es 200µl, aunque se puede cambiar esta configuración a un valor inferior de volumen, hasta un mínimo de 50µl. En el caso de trabajar con una configuración de 50µl, el rendimiento podría bajar.
   El rendimiento estándar del ADN genómico eluído es 4 – 8 µg de una muestra de 200µl de sangre total.
   Conserve el ADN genómico eluído a –20ºC, si no lo va a utilizar inmediatamente.

8.3 Aislamiento de ADN Genómico utilizando el Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico de la serie QuickGene.

Notas: Configuración del sistema y operaciones básicas.
Por favor lea el Manual de Usuario del Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico de la serie QuickGene antes de su uso.

(1) Selección del modo de aislamiento

Seleccione el modo “DNA WHOLE BLOOD” para el aislamiento de ADN genómico de sangre total con el kit.
(ver Apéndice 1)

(2) Colocación de los cartuchos y los tubos

Abra la puerta frontal del instrumento y coloque los tubos de recogida y desecho en el contenedor de tubos de recogida .

- Utilice sólo los tubos especificados de recogida (CT) y los tubos especificados de desecho (WT) incluidos en el kit
  Monte el Contenedor de Cartuchos en el equipo y coloque de 1 a 8 cartuchos en el Contenedor de Cartuchos.
- Utilice sólo los Cartuchos especificados (CA)

Notas: Para detalles sobre el montaje de los tubos y cartuchos consulte el Manual de Usuario del Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico del equipo de la serie QuickGene.
Una colocación incorrecta de los cartuchos puede provocar un aislamiento incorrecto o un vertido no deseado de la solución.
Utilice siempre guantes durante los experimentos para evitar la contaminación con nucleasa.

(3) Colocación de los reactivos

Prepare el volumen requerido (ver 8.1 Preparación de los reactivos) para el tubo del Tampón de Lavado (WDB) con etanol (>99%) y para el tubo del Tampón de Elución (CDB; colóquelos en el contenedor correspondiente y éste en su posición designada en el equipo.

Notas: Utilice siempre guantes durante la manipulación de los reactivos para evitar la contaminación con nucleasa.

- Para detalles sobre la colocación de los reactivos consulte el Manual de Usuario del Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico del equipo de la serie QuickGene.

(4) Descarga

Coloque la “bandeja de descarga” y compruebe la correcta colocación de los tubos de recogida y del contenedor de cartuchos.
Pulse el botón “DISCHARGE” después de haber cerrado la puerta frontal del instrumento.
Nota: La operación de descarga previa a la extracción resulta necesaria debido a que los tubos podrían contener algo de aire, y esto podría provocar una extracción de volumen de reactivos incorrecta.

(5) Aplicación de las muestras preparadas

Inserte el contenido de las muestras de lisado preparadas (Ver 8.2 Preparación de las Muestras), en cada cartucho (CA) utilizando micropipetas (cualquier agregado presente en el lisado deberá transferirse junto con el lisado al cartucho)

(6) Aislamiento

Compruebe que estén bien colocados todos los materiales de trabajo: Tampón de Lavado (WDB) con etanol (>99%), Tampón de Elución (CDB), Cartuchos (CA) con las muestras incluídas, Tubos de Desecho (WT), y tubos ded Recogida (CT).
Cierre la puerta frontal del instrumento.
Confirme que se ha seleccionado el modo de operación apropiado en el panel de operación y pulse el botón [START]

(7) Recogida del ADN genómico
Una vez completado el proceso, el resultado de la extracción se indicará en el panel de operación como sigue:

✔: Extracción satisfactoria
- (guión): Extracción fallida
_ (subrayado): No cartucho, o No muestra

Abra la puerta frontal y retire el Tubo de Recogida (CT) de su alojamiento.

- Ya que el ADN genómico es eluído de los Cartuchos (CA), si se ha utilizado un volumen de 200µl de Tampón de Elución (CDB), se recuperará una solución de ADN de 200µl.

Tapone correctamente los Tubos de Recogida (CT) que contienen el ADN genómico aislado con los Tapones de tubo (CAP)

(8) Recogida de Materiales
Retire los Tubos de Desecho (WT) y deshágase del líquido de desecho de acuerdo con la normativa aplicable.
Retire el contenedor de cartuchos y deshágase de los cartuchos (CA)

> **Advertencia**: En cuanto al tratamiento de los residuos líquidos y los consumibles: Cuando utilice muestras potencialmente infecciosas para sus experimentos, realice el tratamiento de los residuos de acuerdo con la normativa aplicable.

9 Resolución de Problemas

Revise la información que se da a continuación para resolver posibles problemas durante la realización de los experimentos con el kit S de sangre total de QuickGene. Para problemas relacionados con el sistema (esto es, cuando aparezca un mensaje de error en el equipo QuickGene, consulte el Manual de Usuario del equipo de la serie QuickGene.

(1) Bajo rendimiento o no obtención de ADN.

Causa	Posible Solución
Reactivos y sangre total añadidos en orden incorrecto.	Añada los reactivos en los microtubos en el siguiente orden cuando prepare el lisado: Proteasa (EDB disuelta en 3.3 ml de agua libre de nucleasa)→sangre total →Tampón de Lisis (LDB)
Se ha usado una cantidad excesiva de muestra	Reduzca la cantidad de sangre total a una cantidad por debajo de la especificada
Insuficiente homogeinización a continuación de la adición del Tampón de Lisis (LDB)	Mezcle por vortex suficientemente (15 segundos) inmediatamente después de la adición del Tampón de Lisis (LDB).
No se añadió el volumen requerido de etanol al Tampón de Lavado (WDB)	Antes de comenzar compruebe siempre que se ha añadido el volumen requerido de etanol al Tampón de Lavado (WDB)
Se ha utilizado un Tampón de Lavado (WDB) usado previamente (incluido etanol).	Antes del uso, examine visualmente el Tampón de Lavado usado (WDB incluido etanol), el cual ha podido utilizarse durante un día o más en el instrumento
El lisado no se ha aplicado completamente a los cartuchos (CA)	Si hay presentes agregados en el lisado, aplíquelos en los cartuchos junto con el lisado.
Se han usado una cantidad insuficiente de reactivos.	Asegúrese de que hay suficiente cantidad de reactivo en las botellas de reactivo

(2) Obstrucción del Cartucho

Causa	Posible Solución
Se ha usado una cantidad excesiva de muestra	Reduzca la cantidad de sangre total a una cantidad por debajo de la especificada.
Insuficiente homogeinización a continuación de la adición del Tampón de Lisis (LDB)	Mezcle por vortex suficientemente (15 segundos) inmediatamente después de la adición del Tampón de Lisis (LDB).

(3) Experimentos subsiguientes (por ejemplo PCR) insatisfactorios

Causa	Posible Solución
Cantidad inapropiada de ADN usada para experimentos subsiguientes	Determinar la concentración basada en la absorbancia a 260nm

(4) Aparición de precipitados en los reactivos

Causa	Posible Solución
Almacenado a baja Temperatura	Conserve las soluciones entre 15ºC y 28ºC Si hay presentes precipitados, incube la botella en baño de agua a 37ºC y mezcle invirtiendo la botella intermitentemente hasta que se disuelva el precipitado

(5) Los tubos de recogida están vacíos después de la elución

Causa	Posible Solución
Se ha olvidado realizar la Descarga	Coloque la bandeja de descarga y compruebe que los tubos de recogida y el contenedor de cartuchos estén colocados en su posición correcta. Pulse el botón "DISCHARGE" después de cerrar la puerta frontal del instrumento.

	Consulte el Manual de Usuario del equipo de la serie QuickGene.

10 Información sobre pedidos

Producto	**Cat #**
Sistema de Aislamiento Automático de Ácido Nucleico de la serie QuickGene	
Kit S para ADN en tejidos QuickGene	DT - S
Kit de reactivos para aislar ADN genómico en tejidos para QuickGene	
Kit S para ADN en Sangre Total QuickGene	DB - S
Kit de reactivos para aislar ADN genómico de sangre total para QuickGene	
Kit S para ARN en tejidos QuickGene	RT - S
Kit de reactivos para purificar el ARN total en tejidos para QuickGene	
Kit S para ARN en células en cultivo QuickGene	RC - S
Kit de reactivos para purificar el ARN total en células en cultivo para QuickGene	
Kit S ADN en Plásmidos para QuickGene	PL - S
Kit de reactivos para extraer el ADN en plásmidos para QuickGene	

Marca Registrada: Falcon TM (Becton, Dickinson and Company)
La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) está patentada por Roche Molecular Systems y F Hoffmann-La Roche Ltd.

11 Contactos

http://lifescience.fujifilm.com
Fuji Photo Film Co., Ltd. LIFE SCIENCE PRODUCTS DIVISION
26-30, Nishiazabu 2-Chome, Minato-ku, TOKYO 106-8620, JAPAN
Tel:+81-3-3406-2201
Fax:+81-3-3406-2158
E-mail:sginfo@tokyo.fujifilm.co.jp

Filiales

< United States, Canada, Mexico>
Fujifilm Medical System U.S.A.,Inc.
419 West Avenue, Stamford, CT 06902, U.S.A.
Tel:+1-203-324-2000 ext.6112 (1-800-431-1850 ext. 6112 in the U.S.)
Fax:+1-203-351-4713
E-mail:SSG@fujimed.com
URL: http://lifescience.fujifilm.com/

< Europe (excl. UK and Ireland)>
Fuji Photo Film (Europe) GmbH,
Heesenstr. 31, 40549 Dusseldorf, Germany,
Tel: +49-211-5089-174
Fax: +49-211-5089-139
E-mail: lifescience@fujifilmeurope.de
URL: http://www.fujifilm.de

< UK, Ireland >
Fuji Photo Film (U.K) Ltd.
Unit 12 St Martins way, St Martins Business centre, Bedford, MK42 OLF, U.K
Tel:+44-1234-245291
Fax:+44-1234-245293
E-mail: lifesciences@fuji.co.uk
URL:http://www.fujifilm.co.uk/lifesciences/

< China >
Fuji Photo Film (China) Investment Co., Ltd.
31st floor, Hong Kong New World Tower, No.300 Huai Hai Zhong Road, Shanghai P.R China
Tel:+86-21-3302-4655~363
Fax:+86-21-6384-3322
E-mail: wgxiang@fujifilm.com.cn
URL: http://www.fujifilm.com.cn

Distribuidores

<Australia, New Zealand>
Berthold AUSTRALIA PTY Ltd.
40 Clements Avenue, BUNDOORA Victoria 3083, Australia
Tel:+61-3-9467-6277 (1-300-300-865 in Australia)
Fax:+61-3-9467-7493
E-mail: rafael@berthold.com.au
URL: http://berthold.com.au

<Korea>
Shinki Hi-Tec
GUNWHA Bldg. 7-1, Yangjae, 1-dong, Secho-gu, Saoul, 137-886 Korea
Tel:+82-2-572-1600
Fax:+82-2-572-0058
E-mail: info@skhitec.co.kr
URL: http://www.skhitec.co.kr

<Taiwan>
HUNG CHONG CORP.
No.38, Sec. 6, Min Chuan E Road, Taipei, Taiwan
Tel:+886-2-2791-1188
Fax:+886-2-2794-2248
E-mail: fuhsing@mail.hungchong.com.tw
URL: http://www.FUJIFILM.COM.TW

Apéndice 1 El modo "DNA WHOLE BLOOD" se configura con los siguientes parámetros:

	DNA WHOLE BLOOD
PARAMETRO	**VALOR**
BIND PEAK	120
WASH COUNT	3
WASH PEAK	110
WASH VOL1	750
WASH VOL2	750
WASH VOL3	750
WASH VOL4	750
WASH VOL5	750
WASH DIP TM	0
WAS2 WAIT T	0
WAS2 COUNT	0
WAS2 PEAK	110
WAS2 VOL1	750
WAS2 VOL2	750
WAS2 VOL3	750
WAS2 VOL4	750
WAS2 VOL5	750
ELUT VOL	200
ELUT PEAK	100
ELUT DIP TM	0